

ICP-MS研究琥珀酸亚铁片剂的人体药动学及生物等效性

岳向阳^{1,2}, 金鹏飞¹, 曹国颖¹, 胡欣^{1*}, 邝咏梅¹, 李可欣¹, 黄春新³, 王唯红²

(1 卫生部北京医院药学部, 北京 100730; 2 山东大学药学院药物分析研究所, 济南 250012

3 海南省人民医院药学部, 海口 570311)

摘要 目的: 研究琥珀酸亚铁片剂的人体药动学和生物等效性。方法: 按随机交叉实验设计, 20名健康男性受试者单剂量口服给药 200 mg后, 应用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 技术测定血清铁浓度, 并用 BAPP 3.0 软件计算主要的药动学参数。结果: 参比制剂和受试制剂的 $C_{m,ax}$ 分别为 (3028.25 ± 707.44) 和 $(2986.50 \pm 621.07) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $T_{m,ax}$ 分别为 (3.7 ± 1.3) 和 $(4.3 \pm 1.6) \text{ h}$; $t_{1/2}$ 分别为 (27.66 ± 27.38) 和 $(32.91 \pm 32.62) \text{ h}$; $AUC_{0-\tau}$ 分别为 (48394.09 ± 8419.76) 和 $(48459.73 \pm 9242.03) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (81768.39 ± 33624.43) 和 $(91477.34 \pm 48827.18) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 经统计学检验表明, 2种琥珀酸亚铁片剂具有生物等效性。

关键词: 电感耦合等离子体质谱; 琥珀酸亚铁; 药动学; 生物等效性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0326-04

ICP-MS determination of human pharmacokinetics and bioequivalence of ferrous succinate tablets

YUE Xiang-yang^{1,2}, JIN Peng-fei¹, CAO Guo-ying¹, HU Xin^{1*},
KUANG Yong-mei¹, LI Ke-xin¹, HUANG Chun-xin³, WANG Wei-hong²

(1 Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

2 Institute of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China

3 People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, China)

Abstract Objective To study pharmacokinetics and bioequivalence of ferrous succinate tablets in healthy volunteers. **Methods** A single dose of 200 mg reference or tested tablets of ferrous succinate was orally administered to 20 healthy male volunteers in a randomized crossover way. The serum concentrations of Fe were determined by ICP-MS, and the key pharmacokinetic parameters were calculated by BAPP 3.0. **Results** The pharmacokinetic parameters of the reference and tested tablets were as follows: $C_{m,ax}$ were $(3028.25 \pm 707.44) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(2986.50 \pm 621.07) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $T_{m,ax}$ were $(3.7 \pm 1.3) \text{ h}$ and $(4.3 \pm 1.6) \text{ h}$; $t_{1/2}$ were $(27.66 \pm 27.38) \text{ h}$ and $(32.91 \pm 32.62) \text{ h}$; $AUC_{0-\tau}$ were $(48394.09 \pm 8419.76) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(48459.73 \pm 9242.03) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ were $(81768.39 \pm 33624.43) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(91477.34 \pm 48827.18) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** The statistical results showed that the reference and tested tablets were bioequivalent.

Key word: ICP-MS; ferrous succinate; pharmacokinetics; bioequivalence

铁元素是人体需要量最大, 又是最易缺乏的 1 种微量元素, 许多生命活动都需要铁元素的参与。缺铁性贫血 (Iron-deficiency anemia, IDA) 是由于体内铁的储存不能满足正常红细胞生成的需要而发生的贫血。琥珀酸亚铁是目前口服防治 IDA 的一线药物, 对中、重度 IDA 患者的治疗具有疗效高、副作用少、给药方便的特点。

用少、给药方便的特点。

目前, 国内还未见琥珀酸亚铁的人体药动学及生物等效性的研究报告。本文运用电感耦合等离子体质谱 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) 建立了血清铁的测定方法, 并将之应用于琥珀酸亚铁片剂在健康中国男性受试者中的药

* 通讯作者 Tel: (010) 85133636 E-mail: huxinbj@126.com

动力学与生物等效性研究,为临床用药提供了依据。

1 仪器与试剂

电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS): Agilent 7500a(Agilent Technologies Co Ltd USA), Babington 雾化器,镍采样锥和截取锥。METTLER TOLEDO XP 205电子天平:梅特勒公司。超纯水($18.2\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$)由Milli-Q A10 Synthesis纯化系统制备(MILLIPORE公司,法国)。CS-6KR Centrifuge低温离心机:美国 Beckman公司。

浓硝酸(BV-II级,批号071112)购自北京化学试剂研究所。Triton X-100(化学纯,批号T20080807)购自国药集团化学试剂有限公司。冷冻人血清中无机成分分析标准物质(GBW09152铁含量 $1394\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和铁单元素溶液标准物质(GBW08616 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)均购自中国计量科学研究院国家标准物质研究中心。锆元素国家标准溶液(GSB G 62073-90 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)购自国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院。

受试制剂:琥珀酸亚铁片(规格 $100\text{ mg}\cdot\text{片}^{-1}$,批号20090501),湖南华纳大药厂有限公司提供;参比制剂:速力菲(规格 $100\text{ mg}\cdot\text{片}^{-1}$,批号090104),南京金陵药业股份有限公司金陵制药厂提供。

2 方法

2.1 样品测定与数据处理

2.1.1 ICP-MS工作参数 RF功率: 1.3 kW ; 采样深度: 7.6 mm ; 载气流速: $1.15\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 蠕动泵转速: $6\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$; 雾化室温度: $2\text{ }^\circ\text{C}$; 采样模式: Spectrum, 全定量; 采样元素同位素: ^{57}Fe 和 ^{72}Ge (内标同位素); 元素的积分时间: 0.1 s ; 重复次数: 3次; 采样前蠕动泵提升速度: $18\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 提升时间: 25 s ; 采样前蠕动泵平衡速度: $6\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 平衡时间: 30 s 。

2.1.2 稀释液的制备 每 1000 mL 超纯水中分别加入曲拉通(Triton X-100) 1 mL 和浓硝酸(HNO_3) 2 mL ,混匀后冰箱 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,备用。

2.1.3 内标溶液的制备 量取锆元素国家标准溶液(GSB G 62073-90)适量,稀释液逐级稀释至浓度约为 $400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,冰箱 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,备用。

2.1.4 铁元素储备液和溶液的制备 精密量取铁单元素溶液标准物质(GBW08616)适量,用稀释液逐级稀释成 $1000\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铁元素储备液。精密称取铁元素储备液适量,用稀释液稀释成浓度分别为 $40, 100, 200, 400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铁元素溶液,冰箱 4

$^\circ\text{C}$ 保存,备用。

2.1.5 对照品溶液和质控样的制备 精密称取冷冻人血清中无机成分分析标准物质(GBW09152) 0.5 mL ,精密加入内标溶液 0.5 mL ,再分别精密加入铁元素储备液 $0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.00, 4.00\text{ mL}$,并用稀释液定容至 5 mL ,摇匀,即得。同法制备铁元素储备液加入量分别为 $0, 0.50, 1.00, 2.00\text{ mL}$ 的对照品溶液作为质控样。

2.1.6 供试品溶液的制备 精密量取受试者血清 0.5 mL ,精密加入内标溶液 0.5 mL ,稀释液定容至 5 mL ,摇匀,即得。

2.2 受试者与血样采集

2.2.1 受试者 本试验经医院伦理委员会批准,受试者为20名男性健康志愿者,平均年龄 $20\sim 39$ 岁,体重 $55\sim 72\text{ kg}$ 签署知情同意书,试验前进行全面体格检查(包括心率、血压、心电图、血常规、尿常规、肾功能、肝功能等),结果均正常。血清铁和铁蛋白检查以排除轻度贫血或低贮备铁的受试者。受试者无既往病史和药物过敏史,精神状态良好,不吸烟,不嗜酒,试验前2周内未服用任何药物,试验前3个月未服用过任何补铁制剂。

2.2.2 给药与采血方案 采用随机双交叉单剂量口服给药,受试者随机分配到两个给药组,第1组先服用受试制剂后服用参比制剂,另1组先服用参比制剂后服用受试制剂,每次试验间隔1周,单次给药,给药剂量为 200 mg (2片)。受试者在试验前禁食 10 h 禁水 2 h 用 200 mL 温开水服药,给药 2 h 后可自由饮水, 4 h 后统一进标准餐。在给药前及给药后 $1, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 9, 12, 24, 36\text{ h}$ 于上臂分别采集静脉血各 6 mL 于血清管中。血样在 30 min 内用 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 低温离心机 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清,置 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存至测定。

2.3 数据分析 根据测得的琥珀酸亚铁血药浓度-时间数据,应用中国药科大学药代中心编写的BAPP3.0软件进行处理,计算参比制剂和受试制剂的主要药动学参数,并评价两者的生物等效性。

3 结果

3.1 检测限 分别测定稀释液和浓度为 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铁标准溶液各11次,根据公式:检测限($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) = $[3\sigma / (S - B)] \times 40$ 计算检测限。式中: σ 为稀释液中 ^{57}Fe 的每秒计数值(cps)的标准偏差($n = 11$); S和B分别为 ^{57}Fe 在标准溶液和稀释液中的平均cps,计算得到 ^{57}Fe 的检出限为 $5.9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 线性 以铁元素的质量浓度为横坐标(X),

以 ^{57}Fe 和内标同位素 ^{72}Ge 的 cps 比值为纵坐标 (Y), 对“2.1.5”项下制备的对照品溶液进行测定, 并绘制标准曲线。获得的标准曲线方程为:

$$Y = 2.614 \times 10^{-3}X + 0.1928 \quad r = 0.9998$$

表明该方法具有良好的线性。

3.3 精密度及回收率 按“2.1.5”项下规定的制备方法, 制备 4 个浓度的质控样各 5 份, 测定, 测定结果的 RSD 作为日内精密度。并将测得的浓度平均值和理论浓度相比, 计算相对回收率。每天制备和测定各浓度质控样 1 份, 连续 5 d 测定结果的

表 1 精密度及回收率结果 (n = 5)

Tab 1 The results of precision and recovery

加入浓度 (added) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	理论浓度 (theoretical) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内精密度 (intra-day) % , RSD	日间精密度 (inter-day) % , RSD	相对回收率 (relative recovery) %	绝对回收率 (absolute recovery) %
0	139.4	0.47	1.77	103.1 (1.75)	-
100	239.4	1.82	1.40	100.0 (2.73)	87.85 (1.00)
200	339.4	1.57	1.06	99.03 (2.88)	88.07 (0.86)
400	539.4	0.79	0.60	98.67 (0.81)	88.58 (0.38)

注 (note): 括号内为 RSD (RSD is in the parenthesis)

3.4 稳定性 按“2.1.5”项下规定的制备方法, 制备 4 个浓度的质控样多份, 分别考察了血清铁样品室温放置 7 d 内的稳定性、反复冻融 3 次的稳定性、-70 °C 冷冻保存 30 d 内的稳定性, 并考察了样本稀释处理后制备的供试品溶液在 4 °C 冰箱保存 7 d 内的稳定性。结果表明: 各种条件下, 样品测定结果的 RSD 均小于 10%, 样品的稳定性良好。

3.5 药代动力学参数和生物等效性评价 对采集到的血样数据经 BAPP3.0 软件处理后, 20 名受试者服用参比制剂和受试制剂的血药浓度-时间曲线见图 1, 主要药代动力学参数见表 2。

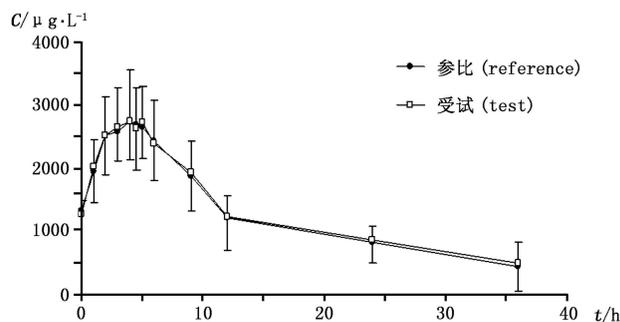


图 1 受试者随机交叉口服参比制剂与受试制剂后的平均血药浓度-时间曲线 (M ± SD, n = 20)

Fig 1 Mean serum concentration-time profiles of reference and tested formulations for volunteers in a randomized crossover way (M ± SD, n = 20)

RSD 作为日间精密度。结果见表 1。

分别测定浓度为 100, 200, 400 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铁溶液, 获得 ^{57}Fe 和 ^{72}Ge 的 cps 比值 (A)。人血清铁标准物质 (GBW 09152) 制备供试品血清, 测定, 获得 ^{57}Fe 和 ^{72}Ge 的 cps 比值 (B)。人血清铁标准物质 (GBW 09152) 分别加入一定量的铁储备液使增加的铁浓度分别为 100, 200, 400 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 测定, 获得 ^{57}Fe 和 ^{72}Ge 的 cps 比值 (C)。C / (A + B) × 100% 即为绝对回收率。结果见表 1。在表中还应该有相对回收率和绝对回收率的 RSD。

表 2 20 名受试者单剂量口服 200 mg 琥珀酸亚铁后的主要药代动力学参数 (M ± SD)

Tab 2 Key pharmacokinetic parameters for 20 healthy volunteers after oral administration of 200 mg ferrous succinate (M ± SD)

参数 (parameters)	参比制剂 (reference formulation)	受试制剂 (tested formulation)
$C_{\text{max}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3028.25 ± 707.44	2986.50 ± 621.07
$t_{\text{max}} / \text{h}$	3.7 ± 1.3	4.3 ± 1.6
$t_{1/2} / \text{h}$	27.66 ± 27.38	32.91 ± 32.62
MRT / h	41.00 ± 38.17	48.57 ± 46.20
$\text{AUC}_{0-\tau} / \text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	48394.09 ± 8419.76	48459.73 ± 9242.03
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	81768.39 ± 33624.43	91477.34 ± 48827.18

C_{max} , $\text{AUC}_{0-\tau}$ 经对数转换后进行方差分析和单侧 t 检验, 90% 置信区间分别为 89.93% ~ 109.2% 和 92.52% ~ 107.7%, 在生物等效范围之内。参比制剂和受试制剂的 T_{max} 经 Wilcoxon 非参数检验, $P > 0.05$ 未见显著性差异。结果表明: 2 种制剂具有生物等效性。

3.6 方法学比较 为进一步验证实验结果的可靠性, 本实验还应用《全国临床检验操作规程》推荐的亚铁嗉比色法^[11], 对所有的样本进行了测定, 测定结果经 BAPP3.0 软件处理后, 获得参比制剂和受试制剂的关键药代动力学参数如下: C_{max} 分别为 (2641.06

± 629.51)和 $(2696.37 \pm 725.41) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; T_{max} 分别为 (4.2 ± 1.0) 和 $(3.6 \pm 1.2) \text{ h}$; $\text{AUC}_{0-\tau}$ 分别为 (41570.81 ± 7868.02) 和 $(42340.43 \pm 9559.06) \text{ g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其关键药动学参数和 ICP-MS法非常接近。 C_{max} 、 $\text{AUC}_{0-\tau}$ 经对数转换后进行方差分析和双单侧 t 检验, 90% 置信区间分别为 90.59% ~ 113.6% 和 93.48% ~ 110.9%, 亦可判定 2 种制剂生物等效。

4 讨论

4.1 内源性物质分析的特殊性 铁是内源性物质, 人体的空白血清(未服药血清)中即含有相当浓度的铁。由于无法获得不含铁的空白血清, 本研究只能应用已经标定了铁浓度的国家一级标准物质“冷冻人血清中无机成分分析标准物质(标准物质编号 GBW 09152)”作为本方法量值溯源的 1 个基点。“冷冻人血清中无机成分分析标准物质(GBW 09152)”是由健康男性血液样本制备、国家标准物质研究中心研制的血清标准物质, 具有法律效力。通过往“冷冻人血清中无机成分分析标准物质(GBW 09152)”加入同样是国家一级标准物质的“铁单元素标准溶液(标准物质编号 GBW 08616)”制备标准曲线, 从而使标准曲线上的每个点都能量值溯源到国家最高标准。

4.2 内源性物质和饮食控制 铁作为内源性物质, 个体间差异较大, 个体内尚有时辰波动^[2], 且易受饮食影响。国内尚无关于内源性药物生物等效性研究的指导原则或统一方案。本实验排除了低铁蛋白及低血清铁的受试者, 尽量降低受试者之间的个体差异; 参照 FDA 关于氯化钾缓释片和胶囊生物等效性指导原则^[3], 在 2 个给药周期前均增加 4 d 饮食

平衡期, 由研究人员和北京医院营养室共同制定食谱, 并计算出每份食物热量和原素铁含量, 所有受试者给予相同标准餐并全部食用, 以尽量减少饮食及个体差异对结果的影响。

4.3 定量同位素及内标同位素的选择 ^{56}Fe 虽然是铁元素中丰度最大的同位素, 但由于 ICP-MS 载气为氩气, 产生的 $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ 离子可严重干扰分析结果, 故而选择干扰最少的 ^{57}Fe 作为定量同位素。锗元素在人体内的含量极低(低于铁 3 个数量级以上), 电离能和铁元素相近, 故而选择 ^{72}Ge 作为内标同位素。

4.4 关于溶血样品 实验表明, 不管是 ICP-MS 法, 还是亚铁嗪比色法, 溶血样品的测定结果都会大幅度地增高, 因而, 在血样处理过程中一定要避免溶血的发生。对于已经发生严重溶血的样品, 应将其排除出统计数据。

致谢: 感谢北京医院营养室、邹定老师、史爱欣老师、李扬老师对本实验的指导和帮助!

参考文献

- 1 YE Ying-wu(叶应妩), WANG Yu-san(王毓三). National Guide to Clinical Laboratory Procedures (全国临床检验操作规程). 2th Ed (第二版). Nanjing (南京): Southeast University Press (东南大学出版社), 1997. 200
- 2 Mahota S, Gary SK, Khullar GK, et al. Kinetics of two different iron formulations and their effect on diurnal variation of serum iron levels. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2004, 25(6): 417
- 3 Food and drug administration Potassium chloride modified-release tablets and capsules in vivo bioequivalence and in vitro dissolution testing 2005. 1

(本文于 2010 年 1 月 14 日收到)